

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-511402

(43) 公表日 平成9年(1997)11月18日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

庁内整理番号

F I

C 1 2 Q 1/02

7823-4B

C 1 2 Q 1/02

// C 1 2 M 1/00

7804-4B

C 1 2 M 1/00

Z

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平7-525951  
(86) (22) 出願日 平成7年(1995)4月10日  
(85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)10月8日  
(86) 国際出願番号 P C T / F I 9 5 / 0 0 1 9 8  
(87) 国際公開番号 W O 9 5 / 2 7 7 9 5  
(87) 国際公開日 平成7年(1995)10月19日  
(31) 優先権主張番号 9 4 1 6 3 1  
(32) 優先日 1994年4月8日  
(33) 優先権主張国 フィンランド (F I)  
(31) 優先権主張番号 9 4 5 7 1 8  
(32) 優先日 1994年12月5日  
(33) 優先権主張国 フィンランド (F I)

(71) 出願人 ボルション テクニリエン トットキムス  
ケスクス  
フィンランド国, フィン-02150 エスポ  
ー, プオリミエヘンティエ 5  
(72) 発明者 イタバラ メルジャ  
フィンランド国, フィン-02150 エスポ  
ー, プオリミエヘンティエ 5 ボルショ  
ン テクニリエン トットキムス  
ケスクス 内  
(74) 代理人 弁理士 功力 妙子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標本の生物分解性を測定する処理方法

(57) 【要約】

この発明は、標本の生物分解性を測定する2つの処理方法に関するものである。標本は、培養液の中に存在し、溶液には二酸化炭素が含まれており、溶液から分離された二酸化炭素の量が測定される。生物分解性は分離された二酸化炭素の量に基づいて決定される。この発明によれば、発生した二酸化炭素はアルカリ溶液中に導入され、この溶液の導電率が測定され、この導電率に基づいて溶液中の二酸化炭素の量が算出される。

★ NOTICES ★

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

- 1. In Art Which Puts Sample into Culture Medium, Carries Out Aeration of Solution, Measures Amount of Carbon Dioxide Separated from Culture Medium, and Measures Biodegradability of Sample of Format of Judging Biodegradability Based on Amount of this Separated Carbon Dioxide The amount of the carbon dioxide which introduced the generated carbon dioxide into the alkali solution of un-precipitating nature, measured the conductivity of said solution, and was attracted in the solution based on this conductivity is computed. Art which measures the biodegradability of the sample by which it is characterized.
- 2. Compute the amount of the carbon dioxide separated during processing as a function of time amount. Art which measures the biodegradability of the sample according to claim 1 by which it is characterized.
- 3. Measure change of conductivity as a function of time amount, memorize this measurement result to a computer, and compute the biodegradability of a sample automatically using an EPD program. Art which measures the biodegradability of the sample according to claim 1 or 2 by which it is characterized.
- 4. In order to remove the generated interfering substance, filter the carbon dioxide generated in culture medium through a proper filter. Art which measures the biodegradability of the sample given in any of claim 1 to claim 3 they are by which it is characterized.
- 5. A carbon dioxide is filtered through activated carbon. Art which measures the biodegradability of the sample given in any of claim 1 to claim 4 they are by which it is characterized.
- 6. In Art Which Puts Sample into Culture Medium, Carries Out Aeration of Solution, Measures Amount of Carbon Dioxide Separated from Culture Medium, and Measures Biodegradability of Sample of Format of Judging Biodegradability Based on Amount of this Separated Carbon Dioxide The generated carbon dioxide is introduced into the alkali solution of un-precipitating nature, change of the conductivity of said solution is measured automatically, this measurement result is stored in a computer, and an EPD program is used for the biodegradability of a sample. By computer It computes automatically. Art which measures the biodegradability of the sample by which it is characterized.

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

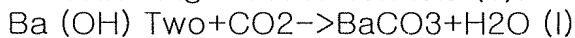
Art which measures the biodegradability of a sample This invention puts a sample into culture medium, carries out aeration of the solution, and relates to the art which measures the biodegradability of the sample of the format of measuring the amount of the carbon dioxide separated from culture medium, and judging biodegradability based on the amount of the separated carbon dioxide.

The abandonment is becoming a serious problem while use of plastics increases increasingly. It is determined to what extent [ quickly and ] a biodegradable rate and extent of decomposition disassemble the matter in the same microorganism environment as a test method how. It is used for assessing extent and time amount of the biodegradability into which plastics is decomposed under an aerobic environment like an effluent liquor purification plant as a result of being obtained with the adopted test method.

Generally, by the approach of measuring biodegradability, the amount of the carbon dioxide generated from a sample by biodegradation is calculated as a function of time amount, and, finally the amount of the organic carbon disassembled within culture medium based on it, and extent and rate of disassembly of a polymer can be judged.

In a SUTSURUMU trial well-known as a standard art, a metaphor places a sample into the test jar into which culture medium was put, and introduces air in a jar through a pipeline system. Before introducing air in the test jar into which culture medium was put, for example, a sodium-hydroxide solution is made to absorb the carbon dioxide in air, and it is removed. By it, it generates in culture medium, and a measurable carbon dioxide is mainly drawn by the biodegradation of a sample by this art. In this system, two or more jars into which culture medium was put can be used in parallel. CO<sub>2</sub> generated from the jar in which culture medium is contained, respectively is introduced into an alkali solution. There are three kinds of standard alkali solutions.

If a carbon dioxide contacts a barium hydroxide, a barium carbonate will be generated as shown in the following reaction formula (1).



The amount of the carbonate generated with the bioreactor, as a result the amount of a carbon dioxide are computed by titration from a barium-hydroxide solution as a function of time amount.

There are some troubles in a SUTSURUMU trial. That is, it is that the leakage style by using the aeration continuously made through some kinds of solutions and a long pipeline arises, and this makes the measurement result incorrectness. Furthermore, when the inside of a system will be in a pressurization condition as a result of continuous aeration, it is that reflux occurs at the time of termination of aeration, and culture medium flows in the flask of a pipeline system or others. By this, the whole trial may be stopped. In the titration accompanying a SUTSURUMU trial, much time amount is taken, therefore test time is prolonged.

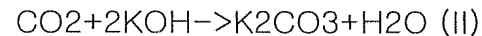
The purpose of this invention is related with the new art which measures the biodegradability of the sample which can be carried out quickly, without requiring an effort while it is trustworthier than before.

Especially the purpose of this invention is offering the art which can measure quickly the amount of the carbon dioxide generated during a trial, without using the titration approach which time amount requires.

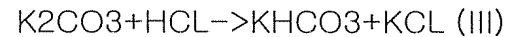
The purpose of further others of this invention is offering the art which can measure automatically with repeatability quickly as much as possible as a result of measurement (i.e., the biodegradability of a sample).

The description of this invention is indicated by the claim.

The art of this invention is based on carrying out aeration of the culture medium continuously within a bioreactor. The carbon dioxide in the poured-in air is removed. The carbon dioxides generated in a microorganism activity are collected by introducing the gas from a bioreactor in the jar containing an un-precipitating nature alkali solution. As an alkali solution, the un-precipitating nature alkali solution of suitable concentration, such as NaOH and KOH, is used, for example. The generated carbon dioxide reacts with an alkali solution, and as shown in a reaction formula (II), it generates a carbonate and water. However, KOH is an alkali solution.



The conductivity of a solution falls as a result of a reaction. The decline in this conductivity is measured by the sensor arranged for example, in a KOH jar. And the carbon dioxide contained in the gas introduced in the KOH solution is judged from measured value as a function of time amount. As long as it is required, based on the following reaction formula (III), the HCL solution which contains phenol FUTAREN as an indicator may be used for the amount of the carbon dioxide introduced into the KOH solution, for example, it may judge it chemically with titration.



The amount of the carbon dioxide which entered into the KOH solution is calculable with a chemical formula (IV).

$$m\text{CO}_2 = \Delta V_{\text{HCL}} \cdot C_{\text{HCL}} + (V_{\text{KOH}} / V_{\text{SAMPLE}}) \cdot M\text{CO}_2 \text{ (IV)}$$

Here Volume of HCL consumed when being based on a  $\Delta V_{\text{HCL}}$  = initial state (ml)

$C_{\text{HCL}}$  Mol concentration of HCL used with = titration (mmol/ml)

$V_{\text{KOH}}$  Volume of = potassium hydroxide solution (ml)

Volume of the KOH sample used with  $V_{\text{SAMPLE}}$  = titration (ml)

$M\text{CO}_2$  The molecular weight of = carbon dioxide, and 44mg/mol As this invention shows, the amount of the carbon dioxide combined in the alkali solution is computed from the conductivity of a solution. As an alkali solution, hydroxylation alkali (NaOH, KOH, LiOH) or the un-precipitating nature alkali solution of arbitration like an aluminum hydroxide can be used, for example. Measurement of conductivity can be carried out by the well-known approach in this field using what [ what is suitable as a sensor ], for example, a suitable platinum electrode. While using an electrode can measure quickness and correctly as a reason for being advantageous especially, a measurement result is obtained in the form of an electric signal. Furthermore, while being able to carry out processing of an electric signal with a well-known electronic technique, a signal is directly transmitted to a computer like [ after being changed into a desired form ] a my KURIRO computer, and the total yield of the generated carbon dioxide or an incidence rate is automatically computed as a function of time amount.

According to the new approach by this invention, since it becomes unnecessary to titrate, a biodegradable judgment becomes still easier.

According to the art of this invention, since a lot of samples can be inspected to coincidence, judgment cost is reducible.

Next, this invention is explained to a detail with reference to an accompanying drawing.

Fig. 1 shows the example of this invention and the equipment for enforcing the art by this invention is shown.

The calibration curve of the conductivity sensor created by the equipment which shows Fig. 2 in Fig. 1 is shown.

The content of the carbon dioxide of the sample Fig. 3 was judged by other approaches and the approach by this invention, respectively to be is shown.

The effect filtration by the activated carbon of  $\text{CO}_2$  which Fig. 4 generated affects a biodegradable result is shown.

As for Fig. 5, the amount (mg) of beta-hydroxy butyrate / carbon dioxide which was disclosed and was generated in the art of this invention in the biodegradation sex test of RATO is shown as a function of time amount.

Fig. 6 is shown by the average from which the amount of beta-hydroxy butyrate / carbon dioxide which was disclosed and was generated in the art of this invention in the biodegradation sex test of RATO was obtained by the concurrency trial.

As for Fig. 7, the amount of beta-hydroxy butyrate / carbon dioxide which was disclosed and was generated in the art of this invention in the biodegradation sex test of RATO is shown as a function of time amount.

The biodegradability which judged Fig. 8 from the sample by the art of this invention is shown as a function of time amount.

Fig. 1 shows the schematic diagram of the equipment for enforcing the art of this invention. An air pump 1 is for using for aeration, and it is arranged in order to attract air in the siphon 3 through the container 2 with which silica gel is contained, and the carbon dioxide in the air in which aeration was carried out by this siphon is attracted, and it is removed. For example, a hydroxide, for example, the carbon-dioxide-removal matter of arbitration like a sodium-hydroxide granule, is sufficient as the siphon 3. Aeration gas after arranging four siphon at a serial and juxtaposition (every two pieces) is introductory \*\*\*\* to the measurement unit 5 which corresponds through the continuous jar 4 containing the barium hydroxide of 0.1M. While CO<sub>2</sub> is certainly removed by it, this result is displayed and the air for aeration is humidified. Only two of eight measurement units 5 are shown by Fig. 1.

The measurement unit 5 is equipped with a bioreactor 6, and the sample examined in it is arranged. In the bioreactor, it is put into culture medium. The capacity of a bioreactor is 2000ml and the amount of culture medium is 1000ml. The gas which occurred within the bioreactor is introduced in the 0.1 measurement jar 6 currently put into the KOH solution of M. In this measurement jar, the measurement sensor which is the electrode 7 for judging the carbon dioxide combined in the KOH solution based on the conductivity of a KOH solution is arranged. Gas is introduced into another jar 9 with which it fills up with the KOH solution from the measurement unit 6 in order to collect CO<sub>2</sub> certainly. It is put into the KOH solution with a concentration [ of 0.1M ] of 300ml by jars 6 and 9, respectively, and this amount of solutions and concentration are sufficient value to combine a 660mg carbon dioxide, respectively.

It connects with the switch train 10 and the electrode arranged in the measurement jar 6 is connected to the data logger 11 for processing and measuring a voltage signal further. Furthermore, a final result is computed by an output signal being transmitted to a computer 12 from the switch train 10 and a data logger 11, respectively, and processing count being carried out. a check valve 13 arranges in a bioreactor 6 -- having -- \*\*\*\* -- culture medium -- for example, fluctuation of a pressure -- or \*\*\*\* which flows backwards to the pipeline system 20 for other reasons is prevented.

Example 1: proofreading of a sensor Proofreading of a sensor is performed by the approach (1971) indicated by Chapman. According to this approach, the solution of KOH and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> is mixed by various ratios, and proofreading liquid is adjusted. As the saturation ratio to the potassium carbonate of the adjusted solution changed in 0 to 100% of range, the solution of KOH of the concentration of 0.1M and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> of the concentration of 0.05M was mixed, and the volume of the solution was 300l.

The sensor has been arranged in a proofreading solution and the electrical-potential-difference value which shows the conductivity of a solution was measured.

Measured value was automatically measured at intervals of 10 minutes between 24 hours, in order to make a sensor into the stable steady state. After a sensor is stabilized, the average is calculated to the last ten measurement results. It considered that this average is a calibration value of the sensor in each saturation ratio of a proofreading solution. The proofreading solution was exchanged for every sensor, stabilization of each sensor was achieved, and the electrical-potential-difference value was recorded. This procedure was repeatedly made until the calibration value about all proofreading solutions was obtained about all sensors.

Fig. 2 shows the measurement result of the proofreading graph obtained by doing in this way. It is known that the conductivity of a solution will be influenced by the temperature of a solution. In order to solve the effect of temperature, they are two different proofreading solutions (a saturation ratio is 0% and 50%, respectively).

The electrical-potential-difference value which shows \*\*\*\*\* was measured as a function of temperature. According to the result, whenever temperature carried out 1-degreeC rise, as for the electrical-potential-difference value, it became clear slightly that only 0.00487V (0% of saturation ratio) and 0.00714V (50% of saturation ratio) fell. Under the conditions when experimenting, it became clear that, as for the temperature of a KOH solution, under 0.1-degreeC was changed. Therefore, the effect of the temperature exerted on an electrical-potential-difference value can be disregarded.

Example 2: measurement of a carbon dioxide The performance test of the sensor for measuring recovery of a carbon dioxide and conductivity using the equipment shown in Fig. 1 was performed. A carbon dioxide is generated from a sodium carbonate. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> of a known amount was added by the flask of the bioreactor containing 1l. ultrapure water. In order to separate a carbon dioxide from a carbonate, HCl of 2.0M was added by the flask. Separated CO<sub>2</sub> was introduced in the flask which

contains KOH of 0.1M with the air for aeration. Based on change of conductivity, the amount of CO<sub>2</sub> collected from the flask by titration was calculated. In the result of a trial, the amount of two carbon monoxide each to conductivity, titer, and a theoretical value is shown to Fig. 3 by the graph. The result shows that recovery of the generated carbon dioxide is effective, and approximates it extremely with the result obtained by different approach, and it is shown from that that the art based on change of conductivity is very good.

Example 3: washing of CO<sub>2</sub> gas In the decomposition trial which used the carbon source the glucose and used the decomposition organic substance as *Escherichia coli*, when it mixed into an alkali solution, generating of another metabolite which raises the electrical-potential-difference value other than a carbon dioxide was accepted. The alkali solution was analyzed by the gravimetric-analysis meter and about 20 kinds of different organic components were detected. It had the polarity expected for the part to influence the conductivity of a solution.

In order to remove these components, the various approaches of washing gas from a bioreactor were tried. Although washing of gas was tried using various washing fluids, it became clear that it is not suitable on effectiveness to remove the volatile organic component which affects the conductivity mixed into gas from a bioreactor. Therefore, washing of the gas by the filtration which lets activated carbon pass was examined. What shows the fundamental configuration of a testing device in Fig. 1 was used. The measurement jars 4, 6, and 8 are equipped with the filter style by activated carbon.

The result of a trial is shown in Fig. 4. In the case of the measurement jar 4, from this drawing, all the carbon dioxides passed the filter style by activated carbon. Consequently, it became clear that each of titer and conductivity was the same values. It set even in the measurement jars 5–8, the filtration by activated carbon acted good, and conductivity resulted in it being less than the level of the result obtained by titration.

In order to remove an volatile organic component, it became clear that filtering the gas from a bioreactor using activated carbon was a procedure which functions good.

Example 4: biodegradable experiment with a polymer It is necessary to show decomposition of the Polly beta-hydroxy petit rate / PARERATO in the art of this invention (PHB/V) as an example of the biodegradability trial by the actual polymer. The biodegradability of PHB/V (100,200 and 300mg) was examined by this experiment.

The trial which carried out Fig. 8 using the fundamental equipment of measurement of conductivity from Fig. 5 is shown gradually. The amount of the carbon dioxide generated within eight bioreactors as a function of time amount is shown in Fig. 5. An upper left drawing is the so-called zero sample (only microorganism intake is not; polymer sample). When the sample of a lower left drawing is 100mg [ per liter ] PBH/V and the sample of an upper right drawing is 200mg [ per liter ] PBH/V, as for the lower right drawing, the case where a sample is 300mg [ per liter ] PBH/V is shown, respectively.

The average of the result of having repeated each \*\*\*\* shown in Fig. 5 is shown in Fig. 6, respectively. These averages are used in order to compute biodegradability.

Next, it subtracts from the value of the carbon dioxide which the carbon dioxide generated with the zero sample jar generated with the measurement jar containing the sample matter, and the result is shown in Fig. 7. When the sample of an upper left drawing is 100mg [ per liter ] PBH/V and the sample of a lower left drawing is 200mg [ per liter ] PBH/V, as for the upper right drawing, the case where a sample is 300mg [ per liter ] PBH/V is shown, respectively.

If the carbon content in a sample is inputted into the program software of a computer, the biodegradability of a sample will be calculated as a function of time amount. Biodegradability expresses the ratio of the yield of the carbon dioxide on the theory calculated based on the organic carbon in a sample, and the carbon dioxide generated from an actual sample. Fig. 8 shows the biodegradability of the sample in this trial to the function of time amount. An upper left drawing When a sample is 100mg [ per liter ] PBH/V, a lower left drawing When a sample is 200mg [ per liter ] PBH/V, as for the upper right drawing, the case where a sample is 300mg [ per liter ] PBH/V is shown, respectively. The result related with the sample containing 100mg PHB/V from the result obtained by titration, for example is calculable.

Apart from the flask arranged at two juxtaposition, at the time of test initiation, the pure KOH solution consumed, HCL of 0.003M also with less reliance than 5.2ml was consumed, and, on the other hand, little [ 5.0ml ] HCL of 0.003M was consumed about the 1ml sample picked out from the alkali measurement jar. The carbon dioxide contained in a KOH measurement jar from the above-mentioned formula by that cause is computed. namely, --  $5.2\text{ml} \times 0.003\text{m mol (ml} \times (300\text{ml} / 1\text{ml}))$

\* 44 mg/m mol = 205.9mg 198mg and the average are 201.95mg, respectively.  
 If 49.4mg which is the average value of the carbon dioxide in a zero sample measurement jar is subtracted from the above-mentioned average value, the amount of the carbon dioxide generated from a sample is computable.  
 That is, it is 152.55mg.  
 If it turns out that the carbon whose 100mg PHB/V is 57.9mg is included, the amount of the carbon dioxide generated theoretically will become clear. That is, it is 212.3mg. Thus, biodegradability becomes clear as follows.  
 biodegradability =(152.55mg / 212.3mg) \*100%=71.8% others -- biodegradability was similarly calculated about the sample. The biodegradability of all the samples calculated from the result of titration and the result obtained with the measuring device of conductivity is shown below.

| 標本    |       | BD率  | BD率  |
|-------|-------|------|------|
|       |       | 滴定値  | 導電率  |
| 100mg | PHB/V | 71.8 | 68.6 |
| 200mg | PHB/V | 77.4 | 81.6 |
| 300mg | PHB/V | 66.8 | 70.3 |

This example is what was shown in order to explain this invention, and does not limit this invention.

---

[Translation done.]

## 【特許請求の範囲】

1. 標本を培養液に入れ、溶液を曝気し、培養液から分離した二酸化炭素の量を測定し、この分離した二酸化炭素の量に基づいて生物分解性を判定する形式の標本の生物分解性を測定する処理方法において、発生した二酸化炭素を非沈殿性のアルカリ溶液中に導入し、前記溶液の導電率を測定し、この導電率に基づいて溶液中に吸引された二酸化炭素の量を算出すること

を特徴とする標本の生物分解性を測定する処理方法。

2. 処理中に分離した二酸化炭素の量を時間の関数として算出すること

を特徴とする請求項1に記載の標本の生物分解性を測定する処理方法。

3. 導電率の変化を時間の関数として測定し、この測定結果をコンピュータに記憶し、標本の生物分解性をEPDプログラムを利用して自動的に算出すること

を特徴とする請求項1又は請求項2に記載の標本の生物分解性を測定する処理方法。

4. 発生した妨害物質を除去するために、培養液中で発生する二酸化炭素を適宜のフィルターを通して濾過すること

を特徴とする請求項1から請求項3のいずれかに記載の標本の生物分解性を測定する処理方法。

5. 二酸化炭素を活性炭を通して濾過すること

を特徴とする請求項1から請求項4のいずれかに記載の標本の生物分解性を測定する処理方法。

6. 標本を培養液に入れ、溶液を曝気し、培養液から分離した二酸化炭素の量を測定し、この分離した二酸化炭素の量に基づいて生物分解性を判定する形式の標本の生物分解性を測定する処理方法において、発生した二酸化炭素を非沈殿性のアルカリ溶液中に導入し、前記溶液の導電率の変化を自動的に測定し、この測定結果をコンピュータに記憶させ、標本の生物分解性をEPDプログラムを利用してコンピュータにより自動的に算出すること

を特徴とする標本の生物分解性を測定する処理方法。



## 【発明の詳細な説明】

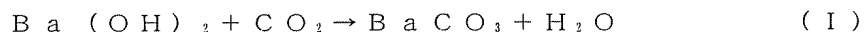
## 標本の生物分解性を測定する処理方法

この発明は、標本を培養液に入れ、溶液を曝気し、培養液から分離した二酸化炭素の量を測定し、分離した二酸化炭素の量に基づいて生物分解性を判定する形式の標本の生物分解性を測定する処理方法に関する。

プラスチックの利用がますます増大するとともに、その廃棄が重大な問題になってきている。生物分解性の速度と分解の程度とが如何に迅速に、又、どの程度まで物質を試験方法と同じ微生物環境で分解するかを決定している。採用した試験方法で得られた結果は、例えば、排出液浄化プラントのような好気性の環境下で、プラスチックが分解される生物分解性の程度と時間とを査定するのに利用されている。

一般に、生物分解性を測定する方法では、生物分解により標本から発生する二酸化炭素の量が時間の関数として算定され、それに基づいて培養液内で分解する有機炭素の量、および重合体の分解の程度と速度とを最終的に判定することが出来る。

標準的な処理方法として公知のスツルム試験では、例えば、標本を培養液を入れたテストジャー中に置き、パイプライン系を通して空気をジャー内に導入する。培養液を入れたテストジャー内に空気を導入する前に、空気中の二酸化炭素は、例えば、水酸化ナトリウム溶液に吸収させて除去される。それによって、培養液中に発生し、この処理方法で測定可能な二酸化炭素は、主として標本の生物分解により導出される。このシステムでは、培養液を入れた複数個のジャーを並行して使用することが出来る。それぞれ培養液が入っているジャーから発生した $\text{CO}_2$ は、アルカリ溶液中に導入される。標準的な3種類のアルカリ溶液がある。二酸化炭素が水酸化バリウムと接触すると、下記の反応式(1)に示すように、炭酸バリウムが発生する。



バイオリアクターで発生した炭酸塩の量、ひいては二酸化炭素の量は、時間の関数として水酸化バリウム溶液から滴定により算出される。

スツルム試験にはいくつかの問題点がある。即ち、数種類の溶液を通して連続的になされる曝気と長いパイプラインを使用することによる漏れ流が生じることであり、これが測定結果を不正確にしている。さらに、連続的な曝気の結果、システム内が加圧状態となると、曝気の終了時に還流が発生し、培養液がパイプライン系やその他のフラスコ内に流入することである。このことによって、試験全体が中止になる場合がある。スツルム試験に伴う滴定では、多くの時間がかかり、そのため試験時間が長引く。

この発明の目的は、従来よりも確実であるとともに、労力を要することもなく迅速に実施することの出来る標本の生物分解性を測定する新規な処理方法に関するものである。

この発明の目的は、特に、時間のかかる滴定方法を用いることなく試験中に発生する二酸化炭素の量を迅速に測定することが出来る処理方法を提供することである。

この発明のさらに他の目的は、測定結果、即ち、標本の生物分解性を可能なかぎり迅速に、且つ、再現性をもって自動的に測定することが出来るような処理方法を提供することである。

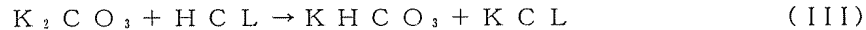
この発明の特徴は、クレームに記載されている。

この発明の処理方法は、バイオリアクター内で培養液を連続的に曝気することを基本としている。注入された空気中の二酸化炭素は除去される。微生物活動で発生する二酸化炭素は、バイオリアクターからのガスを非沈殿性アルカリ溶液が入っているジャー内に導入することにより回収される。アルカリ溶液としては、例えば、NaOH、KOH等の適当な濃度の非沈殿性アルカリ溶液が使用される。発生した二酸化炭素は、アルカリ溶液と反応し、反応式(II)に示すように、炭酸塩と水とを生成する。但し、KOHはアルカリ溶液である。



反応の結果、溶液の導電率は低下する。この導電率の低下は、例えば、KOHジャー内に配置されたセンサーにより測定される。そして、KOH溶液内に導入されたガス中に含まれる二酸化炭素は、時間の関数として測定値から判定される

。必要ならば，KOH溶液中に導入された二酸化炭素の量は，下記の反応式（II I）に基づいて，例えば，指示薬としてフェノールフタレンを含むHCL溶液を使用して，例えば，滴定により化学的に判定してもよい。



KOH溶液の中に入った二酸化炭素の量は，化学式（IV）により計算することが出来る。

$$m_{\text{CO}_2} = \Delta V_{\text{HCL}} * C_{\text{HCL}} + (V_{\text{KOH}} / V_{\text{SAMPLE}}) * M_{\text{CO}_2} \quad (\text{IV})$$

ここで，

$\Delta V_{\text{HCL}}$  = 初期状態を基準とした時の消費したHCLの容積（ml）

$C_{\text{HCL}}$  = 滴定で用いられたHCLのモル濃度（mmol/ml）

$V_{\text{KOH}}$  = 水酸化カリウム溶液の容積（ml）

$V_{\text{SAMPLE}}$  = 滴定で用いられるKOH標本の容積（ml）

$M_{\text{CO}_2}$  = 二酸化炭素の分子量，44mg/mol

この発明が示すように，アルカリ溶液中に結合されている二酸化炭素の量は，溶液の導電率から算出される。アルカリ溶液としては，例えば，水酸化アルカリ（NaOH，KOH，LiOH），または水酸化アルミニウムのような任意の非沈殿性アルカリ溶液を使用することが出来る。導電率の測定は，センサーとして適当なもの，例えば，好適なプラチナ電極を使用してこの分野では公知の方法で実施することが出来る。電極を使用することが特に有利である理由としては，測定を迅速，且つ，正確に行うことが出来るとともに，測定結果が電氣的な信号の形式で得られることである。さらに，電氣的な信号の処理は，公知の電子技術に

より実施することが出来るとともに，信号は所望の形に変換された後，例えば，マイクロコンピュータのような計算機に直接伝送され，発生した二酸化炭素の全発生量，又は発生率が，時間の関数として自動的に算出される。

この発明による新規な方法によれば，滴定を行う必要がなくなるので，生物分解性の判定がさらに容易になる。

この発明の処理方法によれば，大量の標本を同時に検査することが出来るので，判定コストを削減することが出来る。

次に、添付図面を参照してこの発明を詳細に説明する。

第1図は、この発明の実施例を示すもので、この発明による処理方法を実施するための装置が示されている。

第2図は、第1図に示す装置により作成された導電率センサーの校正曲線が示されている。

第3図は、他の方法とこの発明による方法とでそれぞれ判定された標本の二酸化炭素の含有量が示されている。

第4図は、発生した $\text{CO}_2$ の活性炭による濾過が生物分解性の結果に及ぼす影響が示されている。

第5図は、 $\beta$ -ヒドロキシブチレート／バレートの生物分解性試験において、この発明の処理方法で発生した二酸化炭素の量 (mg) が時間の関数として示されている。

第6図は、 $\beta$ -ヒドロキシブチレート／バレートの生物分解性試験において、この発明の処理方法で発生した二酸化炭素の量が並行試験で得られた平均値で示されている。

第7図は、 $\beta$ -ヒドロキシブチレート／バレートの生物分解性試験において、この発明の処理方法で発生した二酸化炭素の量が、時間の関数として示されている。

第8図は、この発明の処理方法により標本から判定した生物分解性が時間の関数として示されている。

第1図は、この発明の処理方法を実施するための装置の概略図を示している。

空気ポンプ1は、曝気に用いるためのもので、シリカゲルが含まれている容器

2を介して空気を吸引管3内に吸引するために配置されており、この吸引管により曝気された空気中の二酸化炭素が、吸引され除去される。例えば、吸引管3は、水酸化物、例えば、水酸化ナトリウム粒剤のような任意の二酸化炭素除去物質でもよい。4つの吸引管を直列および並列に（2個ずつ）配置した後、曝気ガスは、例えば、0.1Mの水酸化バリウムを含んでいる連続したジャー4を介して相当する測定ユニット5に導入さる。それによって $\text{CO}_2$ が確実に除去されると

ともに、この結果が表示され、曝気用の空気は、加湿される。第1図では、8個の測定ユニット5の内、2個だけが示されている。

測定ユニット5はバイオリアクター6を備え、その中に試験される標本が配置されている。バイオリアクター内には培養液が入れられている。バイオリアクターの容量は、例えば、2000 mlであり、培養液の量は、例えば、1000 mlである。バイオリアクター内で発生したガスは、0.1 MのKOH溶液が入れられている測定ジャー6内に導入される。この測定ジャー内には、KOH溶液の導電率に基づいて、KOH溶液中で結合した二酸化炭素を判定するための電極7である測定センサーが配置されている。CO<sub>2</sub>を確実に回収するために、ガスは測定ユニット6からKOH溶液が充填されている別のジャー9に導入される。それぞれジャー6および9には、それぞれ300 mlの0.1 Mの濃度のKOH溶液が入れられており、この溶液量と濃度は、660 mgの二酸化炭素を結合するのに十分な値である。

測定ジャー6内に配置されている電極は、スイッチ列10に接続され、さらに電圧信号を処理し、測定するためのデータロガー11に接続されている。さらに、スイッチ列10とデータロガー11からのそれぞれ出力信号は、コンピュータ12へと伝送され、処理計算されて最終的な結果が算出される。

バイオリアクター6には、チェック弁13が配設されており、培養液が、例えば、圧力の変動によりまたは、その他の理由によりパイプライン系20へと逆流するのを防止している。

#### 例1：センサーの校正

センサーの校正は、例えば、チャップマンによって開示された方法（1971年）により行われる。この方法によれば、種々の比率でKOHとK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の溶液が混合されて校正液が調整される。調整された溶液の炭酸カリウムに対する飽和度が0%から100%の範囲で変化するように、0.1 Mの濃度のKOHと0.05 Mの濃度のK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>との溶液が混合され、その溶液の容積は300 lであった。

センサーは校正溶液中に配置され、溶液の導電率を示す電圧値が測定された。

測定値は、センサーを安定した定常状態にさせるために、24時間の間10分間隔で自動的に測定された。センサーが安定した後、最後の10個の測定結果に対してその平均値が計算される。この平均値を校正溶液のそれぞれの飽和度におけるセンサーの校正値であると見做した。校正溶液はセンサー毎に交換され、各センサーの安定化がはかられ、電圧値が記録された。この手順は、すべてのセンサーについてすべての校正溶液に関する校正値が得られるまで反復してなされた。

第2図は、このようにして得られた校正グラフの測定結果を示している。

溶液の導電率は、溶液の温度により左右されることが知られている。温度の影響を解明するために、2つの異なる校正溶液（飽和度がそれぞれ0%と50%）の導電率を示す電圧値が温度の関数として測定された。その結果によれば、温度が1°C上昇する毎に、電圧値は僅かに0.00487V（0%の飽和度）、および0.00714V（50%の飽和度）しか低下しないことが判明した。実験した時の条件下では、KOH溶液の温度は0.1°C未満しか変動しないことが判明した。従って、電圧値に及ぼす温度の影響は無視することが出来る。

#### 例2：二酸化炭素の測定

第1図に示す装置を用いて二酸化炭素の回収と導電率を測定するためのセンサーの動作試験が行われた。二酸化炭素は炭酸ナトリウムから発生したものである。1リットルの超純水を含むバイオリアクターのフラスコに、既知の量の $\text{Na}_2\text{CO}_3$ が添加された。炭酸塩から二酸化炭素を分離するために、2.0MのHClがフラスコに添加された。分離した $\text{CO}_2$ は、曝気用空気とともに0.1MのKOHを含むフラスコ内に導入された。導電率の変化に基づき、且つ、滴定によってフラスコから回収された $\text{CO}_2$ の量が算定された。試験の結果は、導電率、

滴定値、理論値に対する各二酸化炭素量が、第3図にグラフで示されている。

その結果は発生した二酸化炭素の回収が有効であることを示しており、異なる方法によって得られた結果と極めて近似しており、そのことから導電率の変化に基づく処理方法が極めて良好であることを示している。

#### 例3： $\text{CO}_2$ ガスの洗浄

炭素源をグルコース、分解有機物を大腸菌とした分解試験では、アルカリ溶液

中に混入した時、二酸化炭素の他に電圧値を上げる別の代謝生成物の発生が認められた。アルカリ溶液は重量分析計で分析され、約 20 種類の異なる有機成分が検出された。その一部は溶液の導電率に影響すると見られる極性を有していた。これらの成分を除去するために、バイオリアクターからガスを洗浄する種々の方法が試みられた。ガスの洗浄は種々の洗浄流体を用いて試行されたが、バイオリアクターからガス中に混入した導電率に影響を及ぼす揮発性有機成分を除去することは効率上適切でないことが判明した。従って、活性炭を通す濾過によるガスの洗浄が試験された。試験装置の基本的な構成は、第 1 図に示すものが使用された。測定ジャー 4、6 および 8 は、活性炭による濾過機構を備えている。

試験の結果が、第 4 図に示されている。この図から、測定ジャー 4 の場合、すべての二酸化炭素が活性炭による濾過機構を通過した。その結果、滴定値と導電率とはいずれも同じ値であることが判明した。測定ジャー 5 から 8 までにおいては、活性炭による濾過は良好に作用し、導電率は滴定によって得られた結果のレベルを下回る結果となった。

揮発性有機成分を除去するために、活性炭を使用してバイオリアクターからのガスを濾過することは良好に機能する手順であることが判明した。

#### 例 4：重合体での生物分解性の実験

実際の重合体による生物分解性試験の例として、この発明の処理方法におけるポリ-β-ヒドロキシブチレート／バレラート (PHB/V) の分解を提示する必要がある。この実験では、100、200 および 300 mg の PHB/V の生物分解性が検討された。

第 5 図から第 8 図は、導電率の測定の基本的な装置を用いて実施した試験について、段階的に示されている。第 5 図には、時間の関数として 8 個のバイオリアクター内で発生した二酸化炭素の量が示されている。左上の図面は、いわゆる零標本（微生物摂取のみ；重合体標本ではない）である。左下の図面は、標本がリットル当たり 100 mg の PHB/V の場合、右上の図面は、標本がリットル当たり 200 mg の PHB/V の場合、右下の図面は、標本がリットル当たり 300 mg の PHB/V の場合がそれぞれ示されている。

第6図には、第5図に示す各場合を反復した結果の平均値がそれぞれ示されている。これらの平均値は、生物分解性を算出するために用いられる。

次に、零標本ジャーで発生した二酸化炭素が、標本物質を含む測定ジャーで発生した二酸化炭素の値から減算され、その結果が第7図に示されている。左上の図面は、標本がリットル当り100mgのPBH/Vの場合、左下の図面は、標本がリットル当り200mgのPBH/Vの場合、右上の図面は、標本がリットル当り300mgのPBH/Vの場合がそれぞれ示されている。

標本中の炭素量をコンピュータのプログラムソフトウェアに入力すると、時間の関数として標本の生物分解性が計算される。生物分解性は、標本中の有機炭素に基づいて計算された理論上の二酸化炭素の発生量と実際の標本から発生した二酸化炭素との比率を表している。第8図は、時間の関数に対するこの試験における標本の生物分解性を示しており、左上の図面は、標本がリットル当り100mgのPBH/Vの場合、左下の図面は、標本がリットル当り200mgのPBH/Vの場合、右上の図面は、標本がリットル当り300mgのPBH/Vの場合がそれぞれ示されている。

滴定により得られた結果から、例えば、100mgのPHB/Vを含む標本に関する結果を計算することが出来る。

アルカリ測定ジャーから取り出された1mlの標本について、2つの並列に配置されたフラスコ的一方では、試験開始時に純粋なKOH溶液が消費したよりも5.2mlより少ない0.003MのHCLが消費され、他方では5.0ml少ない0.003MのHCLが消費された。それにより上記の公式からKOH測定ジャーに含まれる二酸化炭素が算出される。即ち、

$$5.2\text{ ml} * 0.003\text{ mモル (ml} * (300\text{ ml} / 1\text{ ml}))$$

$$* 44\text{ mg} / \text{mモル} = 205.9\text{ mg},$$

それぞれ198mg、平均値は201.95mgである。

上記の平均値から、零標本測定ジャー内の二酸化炭素の平均値である49.4mgを減算すると、標本から発生した二酸化炭素の量を算出することが出来る。即ち、152.55mgである。



100mgのPHB/Vが57.9mgの炭素を含んでいることがわかれば、理論上発生する二酸化炭素の量が判明する。即ち、212.3mgである。このようにして生物分解性が次のように判明する。

$$\text{生物分解性} = (152.55 \text{ mg} / 212.3 \text{ mg}) * 100\% = 71.8\%$$

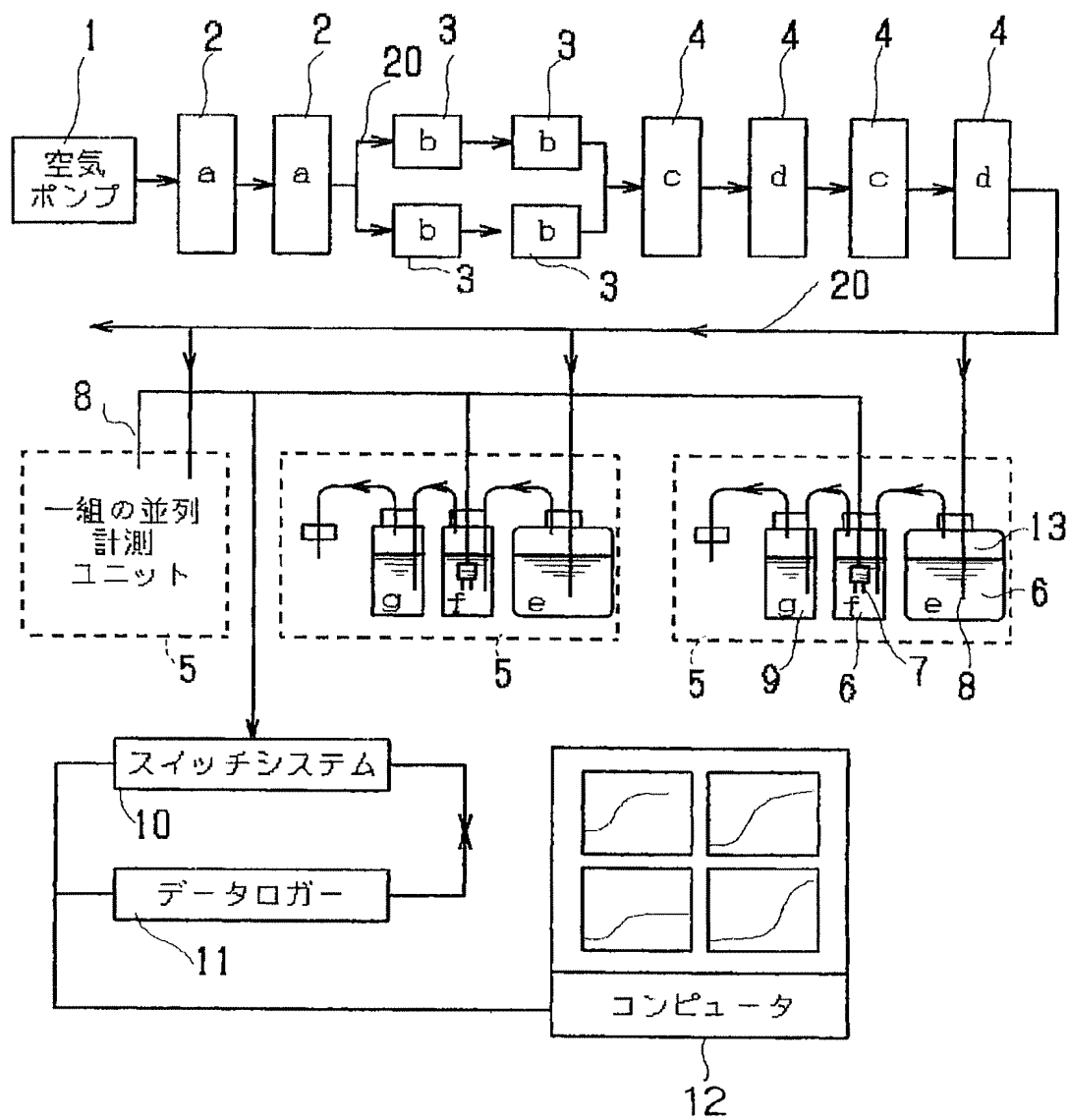
他の標本についても同様にして生物分解性が計算された。滴定の結果、および導電率の測定装置で得られた結果から計算された全ての標本の生物分解性を以下に示す。

| 標本    |       | BD率<br>滴定値 | BD率<br>導電率 |
|-------|-------|------------|------------|
| 100mg | PHB/V | 71.8       | 68.6       |
| 200mg | PHB/V | 77.4       | 81.6       |
| 300mg | PHB/V | 66.8       | 70.3       |

この実施例は、この発明を説明するために示したもので、この発明を限定するものではない。

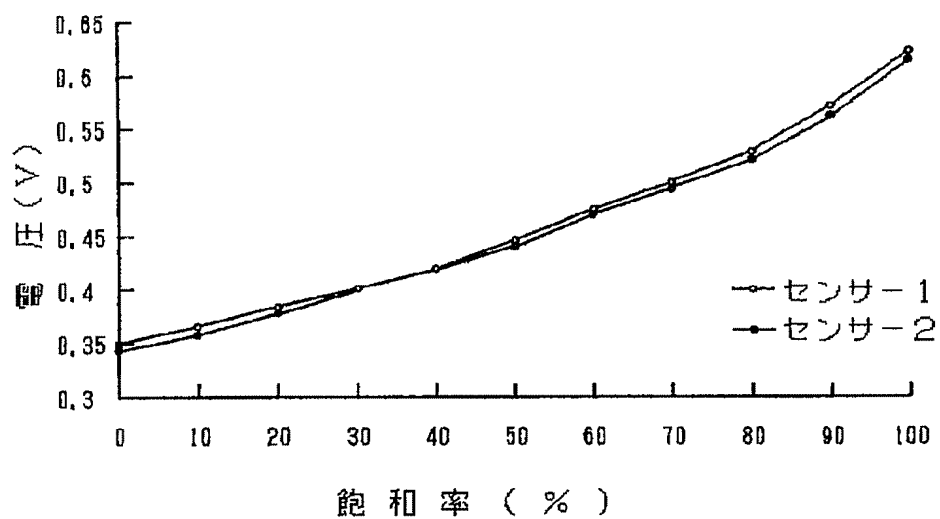
【 図 1 】

第 1 図



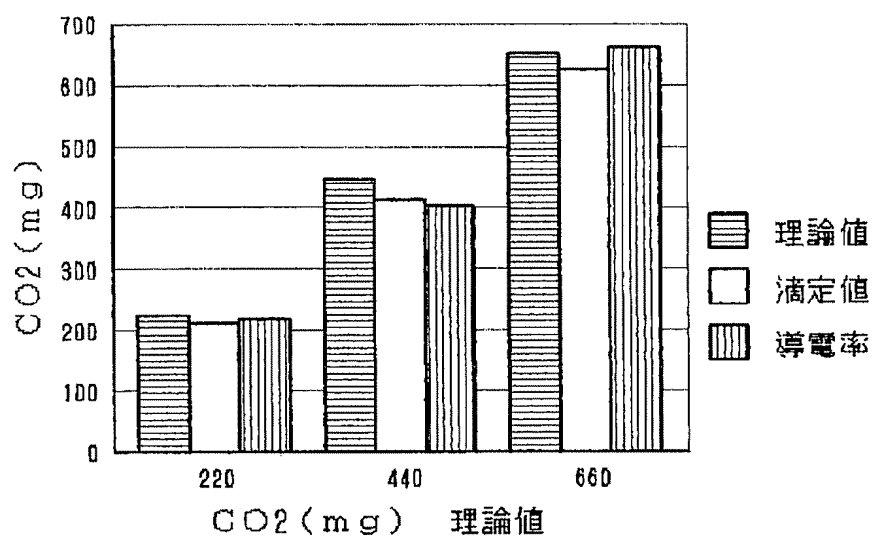
【 図 2 】

第2図



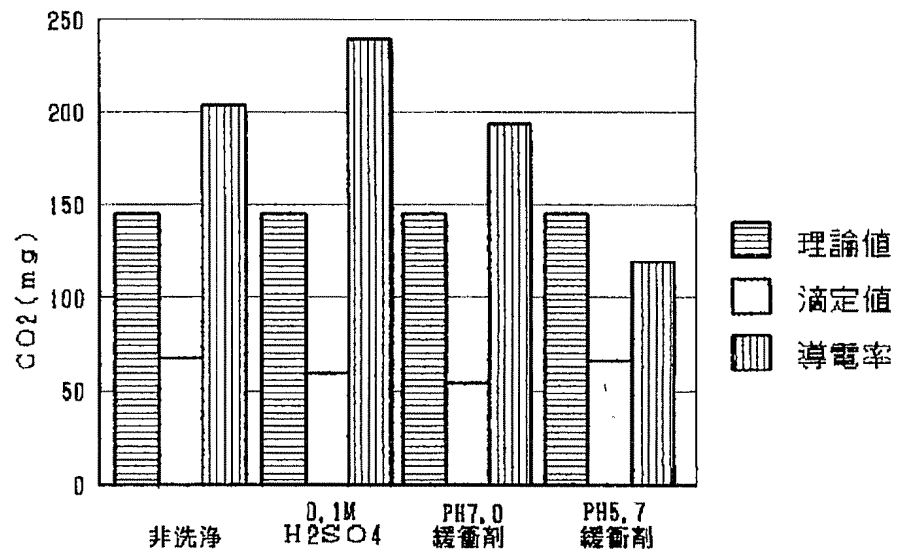
【 図 3 】

第3図



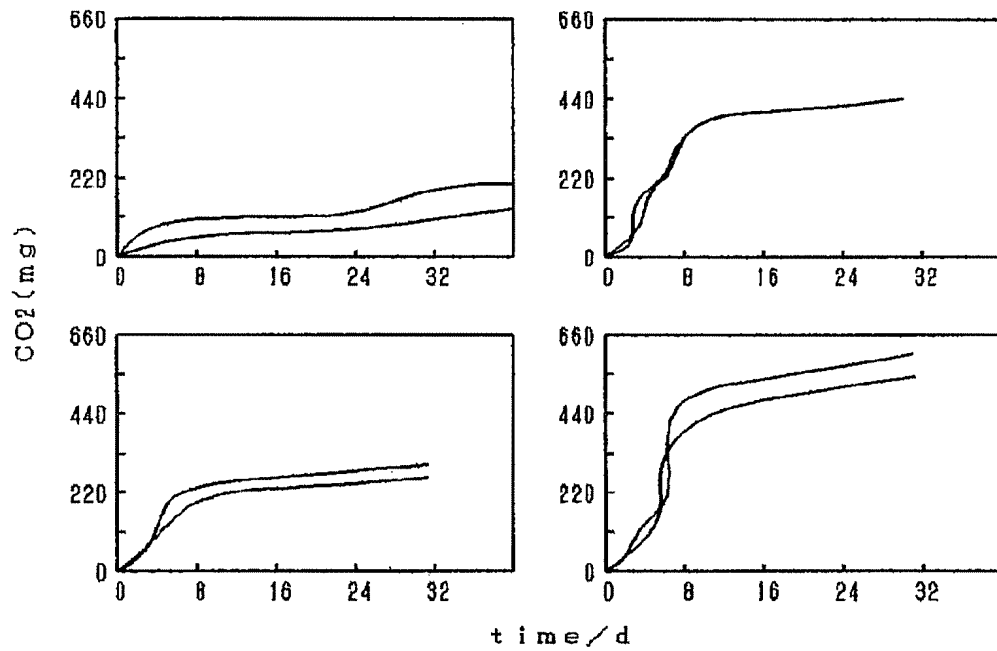
【 図 4 】

第 4 図



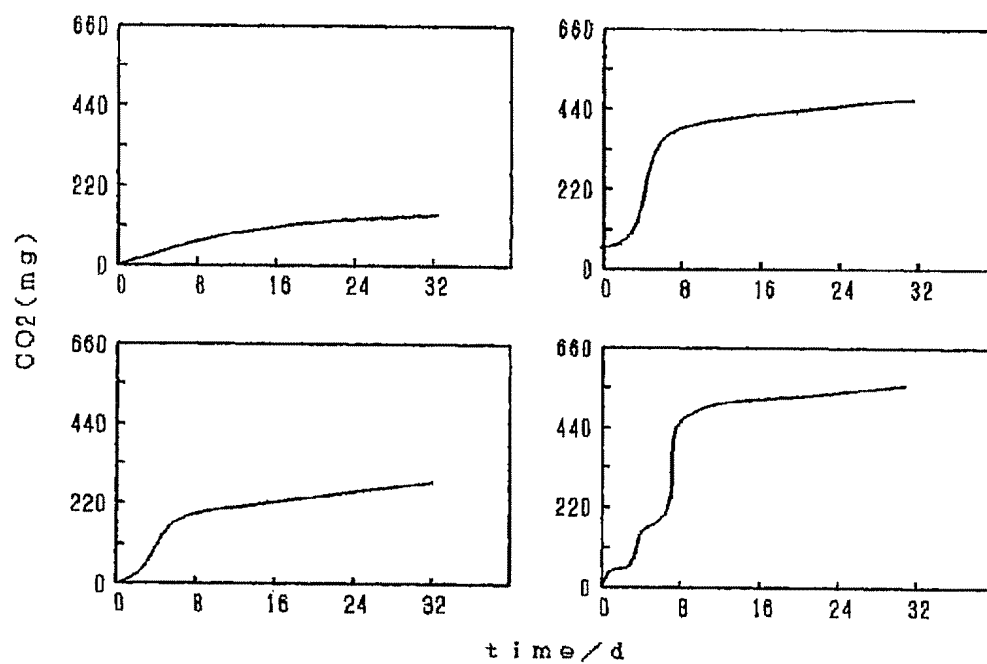
【 図 5 】

第 5 図



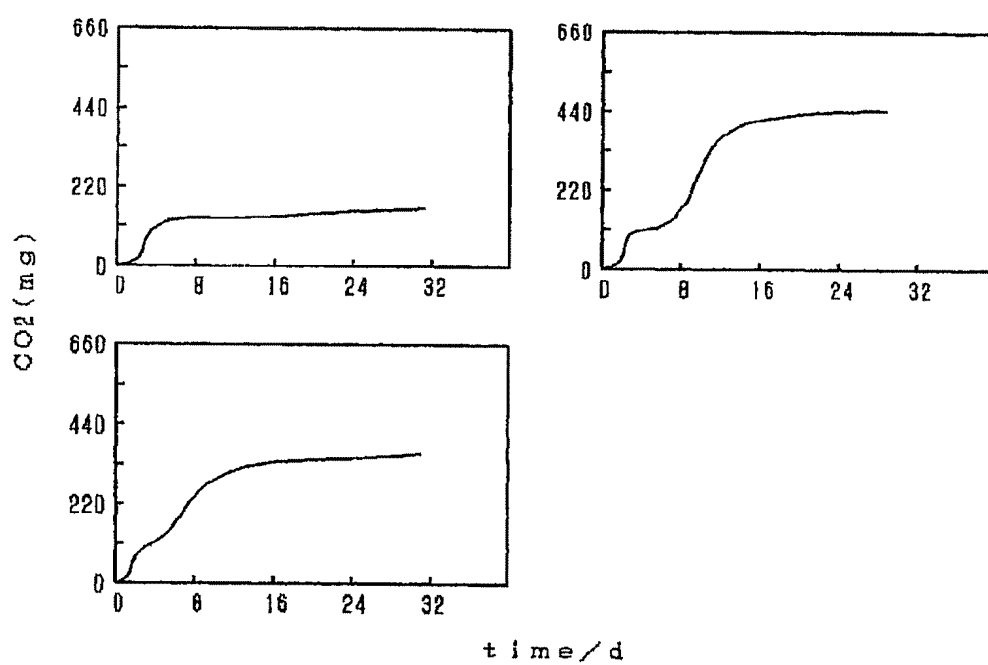
【 図 6 】

第6図



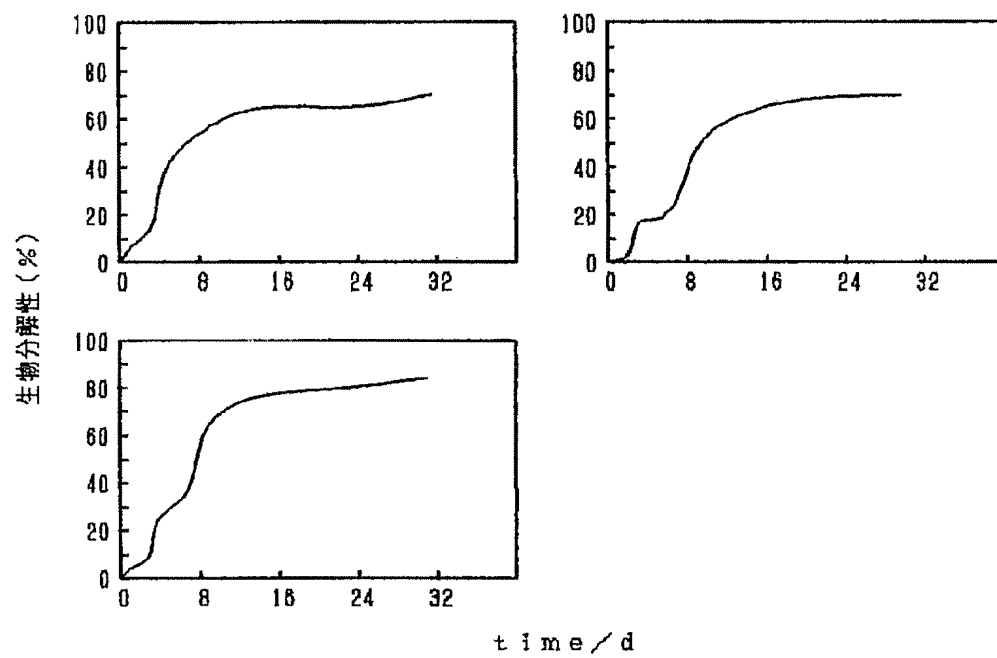
【 図 7 】

第7図



【 图 8 】

第8图



【 国 際 調 査 報 告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/FI 95/00198

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>  |   |   |
|---|---|---|
| <b>IPC6: C12Q 1/02, C12M 1/00</b><br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |   |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>   |   |   |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)   |   |   |
| IPC6: C12Q  |   |   |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched   |   |   |
| SE,DK,FI,NO classes as above  |   |   |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  |   |   |
| WPI, IFIPAT, CA   |   |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |   |   |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages      | Relevant to claim No.   |
| A   | US 5278248 A (JEAN-BERNARD EGRAZ ET AL),<br>11 January 1994 (11.01.94)<br>--            | 1-6   |
| A   | EP 0499302 A1 (ORGANIC WASTE SYSTEMS N.V.),<br>19 August 1992 (19.08.92)<br>--<br>----- | 1-6   |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |   |   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"B" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"&" document member of the same patent family |   |   |
| Date of the actual completion of the international search   |   | Date of mailing of the international search report                              |
| 24 July 1995  |   | 25 -07- 1995  |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Swedish Patent Office<br>Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM<br>Facsimile No. + 46 8 666 02 86   |   | Authorized officer<br>Carolina Gomez Lagerlöf<br>Telephone No. + 46 8 782 25 00 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

29/05/95

International application No.

PCT/FI 95/00198

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)   | Publication<br>date                                      |
|---|---------------------|--|--|
| US-A- 5278248                             | 11/01/94            | CA-A- 2080959<br>EP-A- 0542645<br>FI-A- 925115<br>FR-A,B- 2683532<br>FR-A,B- 2683533 | 13/05/93<br>19/05/93<br>13/05/93<br>14/05/93<br>14/05/93 |
| EP-A1- 0499302                            | 19/08/92            | BE-A- 1004508<br>US-A- 5318909   | 01/12/92<br>07/06/94                                     |



---

フロントページの続き

(81) 指定国            EP (AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
C, NL, PT, SE), CA, JP, US